

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-192199

(43)公開日 平成5年(1993)8月3日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C12Q 1/68

識別記号

ZNA A 8114-4B

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数22(全 13 頁)

(21)出願番号 特願平4-251156

(22)出願日 平成4年(1992)9月21日

(31)優先権主張番号 764462

(32)優先日 1991年9月23日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 390039402

ファイザー・インコーポレイテッド

PFIZER INCORPORATE  
D.

アメリカ合衆国ニューヨーク州 ニューヨ  
ーク、イースト・フォーティセカンド・ス  
トリート 235

(72)発明者 マイケル・ジェイ・バンカー

アメリカ合衆国コネチカット州06340, グ  
ロートン, シェネコセット・パークウェイ  
228

(74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞中の特異的mRNAおよびDNAの検出法

(57)【要約】

【目的】 インビボ細胞またはインビトロで保存された細胞中に存在する特異的mRNAの存在を検出し、またはその量を測定する方法を提供する。

【構成】 本発明方法は、原核生物および真核生物のスクリーニングに利用することができ、これにはヒトを疾病状態の存在につきスクリーニングすることが含まれる。本発明方法は、化学物質が1種類または数種類の遺伝子産物に及ぼす作用であって、それらの遺伝子の転写により生じるmRNAの存在および量によって示されるものをインビトロスクリーニングするためにも利用しうる。本発明方法は特に、多数の化合物をそれらの化合物が遺伝子産物に及ぼす作用につきスクリーニングするのに好適である。さらに本発明は、細胞中の特異的mRNAの存在に作用を及ぼしうる化合物に関するものである。本発明方法はウイルス、微生物、植物および動物における新規な遺伝子構造体の同定にも利用しうる。また、本発明は細胞からRNAおよびDNAを単離するための新規な方法に関するものである。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞中の特異的mRNAの存在を検出するための、下記工程を含む方法：

(a) その中で細胞が培養された、またはその中に細胞が存在する培地または生物学的流体を除去し；

(b) 容器内で細胞に水を添加し、そして容器を約90—約115℃の温度の液体中に約2—約12分間保持して細胞を溶解することにより、細胞溶解質を調製し；

(c) 細胞溶解質を放冷し；

(d) 細胞溶解質中に存在する特異的配列1または2以上を含むmRNAから1または2以上のcDNA配列を調製し；

(e) これら1または2以上のcDNA配列のコピー数を増幅し；そして

(f) これら1または2以上のcDNA配列の存在を検出する。

【請求項2】 細胞中の1または2以上の特異的DNA配列の存在を検出するための、下記工程を含む方法：

(a) その中で細胞が培養された、またはその中に細胞が存在する培地または生物学的流体を除去し；

(b) 容器内で細胞に水を添加し、そして容器を約90—約115℃の温度の液体中に約2—約12分間保持して細胞を溶解することにより、細胞溶解質を調製し；

(c) 細胞溶解質を放冷し；

(d) これら1または2以上のDNA配列のコピー数を増幅し；そして

(e) 増幅された1または2以上のDNA配列の存在を検出する。

【請求項3】 工程(b)の前に、細胞を等張液で洗浄し、そして細胞から等張液を除去する追加工程を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 工程(f)において1または2以上のcDNA配列の存在を検出することが、それら1または2以上のcDNAの量を定量することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 工程(b)において、容器が約99℃の温度の液体中に約4—約8分間保持される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項6】 工程(e)の前に、cDNA配列を加熱し、次いで該cDNA配列をプロテイナーゼで処理する追加工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 工程(e)の前に、cDNA配列を加熱し、次いで該cDNA配列をプロテイナーゼで処理する追加工程を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項8】 工程(b)の前に、細胞を等張液で洗浄し、そして細胞から等張液を除去し；工程(e)の前に、cDNA配列を加熱し、次いで該cDNA配列をプロテイナーゼで処理する追加工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 工程(b)において、容器が約99℃の

温度の液体中に約6分間保持される、請求項3または8に記載の方法。

【請求項10】 工程(b)において容器が約99℃の温度の液体中に約6分間保持され、工程(d)が、1または2以上の特異的mRNA配列に相補的な配列のDNAオリゴマーをアニールし、これから逆転写酵素により1または2以上のcDNA配列を調製することを含む、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 工程(e)がポリメラーゼ連鎖反応により1または2以上のcDNA配列を増幅することにより、工程(f)において1または2以上のcDNA配列の存在を検出することがそれら1または2以上のcDNAの量を定量することを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 工程(e)において、cDNAのコピー数が1または2以上の放射性標識ヌクレオチドまたは検出可能なヌクレオチド同族体の存在下で増幅される、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 工程(b)の前に、細胞を等張液で洗浄し、そして細胞から等張液を除去する追加工程を含む、工程(b)において容器が約99℃の温度の液体中に約6分間保持され、工程(d)がポリメラーゼ連鎖反応により1または2以上の特異的cDNA配列を増幅することよりなる、請求項2に記載の方法。

【請求項14】 工程(e)において、ポリメラーゼ連鎖反応が1または2以上の放射性標識ヌクレオチドまたは検出可能なヌクレオチド同族体の存在下で実施される、請求項11に記載の方法。

【請求項15】 工程(b)の前に、細胞を等張液で洗浄し、そして細胞から等張液を除去する追加工程を含む、工程(b)において容器が約99℃の温度の液体中に約6分間保持され、工程(d)において1または2以上の特異的cDNAのコピー数が1または2以上の放射性標識ヌクレオチドまたは検出可能なヌクレオチド同族体の存在下で増幅される、請求項2に記載の方法。

【請求項16】 工程(d)において、1または2以上の特異的cDNAのコピー数が1または2以上の放射性標識ヌクレオチドまたは検出可能なヌクレオチド同族体の存在下で増幅される、請求項13に記載の方法。

【請求項17】 放射性標識ヌクレオチドを用いる場合、増幅された1または2以上のcDNAまたはDNA配列の存在が、存在する放射能の直接または間接測定により検出される、請求項12、14、15または16に記載の方法。

【請求項18】 工程(f)において、1または2以上のcDNA配列の存在が、それら1または2以上のcDNA配列を1または2以上の放射性標識DNAプローブとハイブリダイズさせ、そしてそれら1または2以上のcDNA配列にハイブリダイズした放射能を測定することにより検出される、請求項1または11に記載の方

法。

【請求項19】 工程(e)において、1または2以上の増幅DNA配列の存在が、それら1または2以上の増幅DNA配列を放射性標識DNAプローブとハイブリダイズさせ、そしてそれら1または2以上の増幅DNA配列にハイブリダイズした放射能を測定することにより検出される、請求項2または13に記載の方法。

【請求項20】 インビトロで異なる条件下に培養された細胞中の1または2以上の特異的mRNA配列の存在の変化を判定するための、下記工程を含む方法：

(a) 第1群の細胞を培養し；

(b) 第2群の上記細胞を第1群の細胞の場合と異なる培養条件下で培養し；そして

(c) 第1群および第2群の細胞中の1または2以上の特異的mRNA配列の存在を、請求項1または18に記載の方法により別個に判定する。

【請求項21】 インビトロで培養された細胞中の1または2以上の特異的mRNA配列の存在に対する1化合物の作用を判定する方法において、第2群の細胞を該化合物の存在下で培養することを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 インビトロで培養された細胞中の1または2以上の特異的mRNA配列の存在に対する複数の化合物の作用を判定する方法において、それらの化合物それぞれに関する作用を請求項21に記載の方法により同時に、または実質的に同時に判定することよりなる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、インビトロで保存された細胞中に存在する特異的mRNAの存在を検出し、またはその量を測定する方法に関するものである。本発明方法は、原核生物および真核生物のスクリーニングに利用することができ、これにはヒトを疾病状態の存在につきスクリーニングすることが含まれる。本発明方法は、化学物質が1種類または数種類の遺伝子産物に及ぼす作用であって、それらの遺伝子の転写により生じるmRNAの存在および量によって示されるものをインビトロスクリーニングするためにも利用しうる。本発明方法は特に、多数の化合物をそれらの化合物が遺伝子産物に及ぼす作用につきスクリーニングするのに好適である。さらに本発明は、細胞中の特異的mRNAの存在に作用を及ぼしうる化合物に関するものである。

【0002】 さらにまた、本発明方法はウイルス、微生物、植物および動物における新規な遺伝子構造体の同定にも利用しうる。また、本発明は細胞からRNAおよびDNAを単離するための新規な方法に関するものである。

【0003】

【従来の技術】 96ウェルマイクロタイターディッシュ形式で遺伝子産物である蛋白質の発現を特異的に監視するために、酵素増幅による抗体アッセイ法が効果的に用いられている。The Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA), ボラー, ビドウェルおよびバートレット (Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A.) (1979) ISBN 0-906036-01-1. を参照されたい。しかし同様にmRNA遺伝子産物を96ウェルマイクロタイターディッシュ形式で監視する試みは、採用した方法の感度の欠如、および簡便なmRNA単離法が無いことにより失敗した。Current Protocols in Molecular Biology, アウスベル, プレント, キングストン, ムーア, セイドマン, スミスおよびストルー (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moor, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl), EDS., グリーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ワイリーインターサイエンス (1987)。さらに特定の遺伝子の増加および/または減少調節は、後続検出可能な遺伝子産物の異種発現に依存するレポーター遺伝子構造体により間接的に測定しうる。Current Protocols in Molecular Biology, 前掲。後者の方法は有用ではあるが、それには幾つかの制限がある。それらの制限には下記のものが含まれる：適宜な構造体を調製し、同定し、そして解明する必要がある；その構造体は異種プロモーターおよびレポーター遺伝子からなり、このためプロモーターを入手し、解明することが必要になる；プロモーター活性のみが測定される；活性の測定に酵素を用いることは、翻訳および/または酵素の阻害剤がアッセイの統合性を損なう可能性があることを意味する；ならびにレポーター遺伝子の挿入 (integration) が天然染色体部位を標的とせず、しばしば細胞当たり多重コピーが生じ、これは遺伝子調節に作用を及ぼす可能性がある。

【0004】 特定の遺伝子に対する特異性を付与するための遺伝子特異性オリゴマー、および特異的遺伝子配列を検出可能な水準にまで増幅するための特定のDNAポリメラーゼを用いる方法、即ち一般にポリメラーゼ連鎖反応またはPCRとして知られている方法が、サイキ (Saiki, R.) ら, Science 230:1350 (1985) およびサイキ (Saiki, R. K.) ら, Science 239:487 (1988) に記載されている。

【0005】 96ウェルマイクロタイターディッシュのウェル中においてインビトロで培養された細胞からmRNAを検出しうるということが報告されている。ルセル・ヒグチ (Russel Higuchi), PCRのための



簡単かつ迅速な試料調製法, *PCR Technology*, ヘンリーA. エルリッヒ (Henry A. Ehrlich) 編, M. ストックトン・プレス (1989)。しかしそこで用いられているmRNA単離法は、特にスクリーニングが複数の試料を伴うものである場合、スクリーニング法にPCRを利用するのに役立たない。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、細胞中の特異的mRNAおよびDNA配列を検出および測定するための新規な方法に関するものである。さらに本発明は、細胞からRNAおよびDNA配列を調製するための新規な方法に関するものである。本発明方法に用いられる細胞は、インビトロから直接採取されたものであってもよく、またはインビトロで保存されたものであってもよい。本発明方法により検出される特異的mRNA配列はいずれかのクラスまたはタイプに限定されない。ここに記載される方法は、それからcDNAを産生しうる限りいかなるmRNA種にも利用しうる。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】細胞中の特異的mRNA配列を検出および測定するための新規な本発明方法は、場合に応じて細胞から生物学的流体または培地を除去し；容器内で細胞に水を添加し、そして容器を約90—約115℃の温度の液体中に約2—約12分間保持して細胞を溶解することにより、細胞溶解質を調製し；細胞溶解質を放冷し；細胞溶解質中に存在するmRNA配列1または2以上からcDNA配列を調製し；これら1または2以上のcDNA配列のコピー数を増幅し；そしてこれら1または2以上のcDNA配列の存在を検出し、かつ所望によりその量を測定する工程を含む。所望により、かつ好ましくは、細胞溶解の前に細胞を等張液で洗浄し、次いで細胞から等張液を除去する。さらに所望により、かつ好ましくは、cDNA配列を含有する細胞溶解質を増幅の前にプロテイナーゼで処理する。好ましいプロテイナーゼはプロテイナーゼKである。さらに、細胞を入れた容器を約99℃の温度の液体中に約4—約8分間保持することにより細胞を溶解することが好ましく、約6分の期間が特に好ましい。

【0008】細胞中の特異的DNAを検出するための新規な本発明方法は、場合に応じて細胞から生物学的流体または培地を除去し；容器内で細胞に水を添加し、そして容器を約90—約115℃の温度の液体中に約2—約12分間保持して細胞を溶解することにより、細胞溶解質を調製し；細胞溶解質を放冷し；目的とするDNA配列のコピー数を増幅し；そしてこれらDNA配列の存在を検出する工程を含む。上記のように所望により、かつ好ましくは、細胞溶解の前に細胞を等張液で洗浄し、そして等張液を除去する。同様に、細胞を入れた容器を約99℃の温度の液体中に約4—約8分間保持することにより細胞を溶解することが好ましく、約6分の期間が特に好ましい。

より細胞を溶解することが好ましく、約6分の期間が特に好ましい。

【0009】上記方法に用いられるRNAおよびDNAを単離するための新規な方法は、それからRNAおよびDNAを得ることを目的とする細胞に容器内で水を添加し、そして容器を約90—約115℃の温度の液体中に約2—約12分間保持して細胞を溶解することにより、約99℃の温度および約4—約8分の期間が好ましい。約6分の期間が特に好ましい。調製された細胞溶解質は細胞残屑を含み、RNAおよびDNAを含む細胞質内容物はその中に存在する。

【0010】新規な本発明方法は簡便な核酸調製法を提供し、これを当業者に周知の各種方法で増幅することができる。その1方法は、ポリメラーゼ連鎖反応またはPCRとして知られるものである。

【0011】ここに記載する方法は極めて簡便であるので、異なる細胞または異なる処理が施された細胞の多数の試料を、それらの細胞内の特異的mRNA配列を検出し、かつ所望により定量するために、本発明方法によりアッセイすることができる。本発明方法は、化合物が細胞の特異的mRNA配列の存在に及ぼす作用をスクリーニングするのに特に有用である。従って本発明方法は薬物探索法として好適であり、多数の化合物をスクリーニングする高い処理量が得られる。従って本発明は、本発明方法により同定された、細胞内の特異的mRNA配列の存在に作用する化合物に関するものでもある。

【0012】本発明方法を用いることにより、2以上のmRNA配列を同時にアッセイすることができる。たとえばG-CSFおよびGM-CSF配列に関するハイブリダイゼーションをキナーゼ処理プローブ (kinased probe) により同時に行うことができる。双方の場合ともG—またはGM-CSF mRNA水準の増加が目的だからである。所望により、検出法の異なるオリゴマープローブを用いて個々の産物を別個に測定することもできる (たとえば放射性同位体—対—蛍光、および/または異なる比活性をもつ放射性同位体)。さらに、洗浄およびリプローブ (reprobe) が可能である。測定される多様な産物の数を高める方法として、または特異的産物の検出を高める方法として、増幅された物質を2または3枚以上のナイロン膜間で分割することも可能である。

【0013】しかし新規な本発明方法はこのような高処理量のスクリーニングにおける利用に限定されない。本発明方法は、1または2以上の外来遺伝子が導入されたウイルス、微生物、動物および植物を含めたキメラ生物の同定にも有用である。たとえば、それらのキメラ生物の同一性および安定性を本発明方法の利用によりアッセイすることができる。さらに本発明方法により、同時増幅された (co-amplified) 遺伝子またはその一部を研究することによって遺伝子構造および遺伝子

の挿入を判定することができる。

【0014】本発明方法は臨床法および診断法としても有用である。本方法によれば、特定の疾病状態に伴う特異的mRNAの存在を検出する。たとえば本発明により提供される高感度の方法によって、転移前の潜伏期の癌に伴うある種のmRNAの存在を検出することができる。従って本方法をこのような様式で利用することにより、癌進行の初期段階で処置を開始することができる。他の例としては、エイズ感染者において活性感染 (active infection) に伴うmRNAの存在を本発明方法により検出することができる。従って活性エイズ患者の診断が可能である。

【0015】本発明の実施に際して用いるのに適した緩衝液および試薬は下記のものである：

20×逆転写酵素/Taqポリメラーゼ緩衝液

1M トリス-Cl, pH 8.3

1M KCl

80mM MgCl<sub>2</sub>

アニーリング/RT緩衝液 (ウェル当たり)

8.13 μl 無菌蒸留水

1.00 μl 10×逆転写酵素/Taqポリメラーゼ緩衝液

0.64 μl 25mM dNTP (25mM dATP, 25mM dTTP, 25mM dGTP, 25mM dCTP)

0.09 μl 1Mジチオトレイトール

0.04-0.08 μl Xプライマー (1 μg/μl)

0.01 μl RNasin (50U/μl)

0.01 μl AMV逆転写酵素 (32U/μl)

PCR試薬 (10 μl当たりの添加量)

8.68 μl 無菌蒸留水

1.0 μl 10×逆転写酵素/Taqポリメラーゼ緩衝液

0.04-0.08 μl Xプライマー (1 μg/μl)

0.20 μl Taqポリメラーゼ (5U/μl)

ドットプロットDNA変性用溶液

444mM NaOH (160ml 500mM NaOH)

11mM EDTA (8ml 250mM EDTA)

0.00074%インク (16 μl 10%インディアインク)

22ml 蒸留水

1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2 (Na<sup>+</sup>において1M)

134g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

4ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

H<sub>2</sub>Oにより1リットルとなす

ハイブリダイゼーション緩衝液

7% SDS

5× SSC

20mM NaPO<sub>4</sub>

10× デンハルト溶液

ハイブリダイゼーション洗浄液

1% SDS

1× SSC

20× SSC

3M NaCl (175g/L)

10 0.3M クエン酸ナトリウム · 2H<sub>2</sub>O (88g/L)

1M HClによりpH 7.0に調整

100× デンハルト溶液

2% フェイコル400

2% ポリビニルピロリドン

2%ウシ血清アルブミン (ペンタックス フラクションV)

10×キナーゼ緩衝液

500mM トリス-Cl, pH 7.4

20 100mM MgCl<sub>2</sub>

50mM DTT

上記試薬の酵素は市販されている。たとえばRNasinはベーリンガー・マンハイムから得られ、AMV逆転写酵素はモレキュラー・ジェネティックス社から得られ、Taqポリメラーゼはパーキン・エルマーから得られる。上記緩衝液および試薬の他の成分もすべて市販されている。さらに原液を滅菌することが好ましい。

【0016】本発明方法に用いられる細胞は動物または植物から単離し、ここに記載する方法に直接用いることができる。あるいは、かつ好ましくは、高処理量のスクリーニングを実施する際、細胞を本発明方法に用いる前に適宜な条件下で培養する。本明細書および特許請求の範囲全体を通して、動物という語は哺乳動物、たとえばヒトを含むが、これらに限定されない。本発明において細胞は真核細胞に限定されず、原核細胞をも包含する。

【0017】細胞は周知の方法に従って各種容器、たとえばマイクロタイターディッシュまたはマイクロタイターチューブ内で培養することができる。マイクロタイターディッシュは6、24、48、96または144ウェルのものが市販されている。マイクロタイターディッシュの使用は本発明方法を高処理量のスクリーニングに利用するために好ましい。細胞は他の適宜な容器、たとえばローラーボトルまたはペトリ皿内でも培養しうるが、それらの容器はその大きさおよび付随する取扱いの問題のためさほど適切ではない。しかし本発明方法は細胞を培養する方法および/または装置に限定されない。マイクロタイターディッシュの業者にはコスター、ファルコン、ナンクおよびコーニングが含まれる。

【0018】本発明方法に用いる真核細胞を培養するための1方法は、目的数のウェルを備えたマイクロタイター

ディッシュまたはマイクロタイターチューブに適宜な数の細胞を接種することによる。接種に最適な細胞数は当業者により決定され、細胞の種類およびアッセイのターゲットに応じて異なるであろう。この決定には、漸増する数の細胞を接種された一連のアッセイすべき細胞タイプの培養物に後記の操作を施す必要があるにすぎない。従ってこの決定は本明細書の記載から十分に当業者がなしうる範囲内にある。たとえば、ネズミまたはヒト線維芽細胞を用い、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球-コロニー刺激因子 (G-CSF)、および/またはアルドラーゼの mRNA を後記の本発明方法に従ってアッセイする場合、96 ウェル-マイクロタイターディッシュのウェル当たり  $1 \times 10^4$  個のトリプシン処理細胞が適切な接種細胞数であることが認められた。

【0019】接種された細胞を次いで適切な期間増殖させる。この増殖期間は接種された細胞のタイプ、および細胞を増殖させる条件に応じて異なる。当業者は、この増殖の目的とする結果は適切な生理学的状態で後記の本発明方法の後続工程を実施するのに十分な細胞数を得ることである点を留意して、この増殖に適した期間を容易に決定することができる。適切な生理学的状態とは、細胞がターゲット mRNA 種のモジュレーションを受けやすい状態にあることを意味する。たとえばネズミまたはヒト線維芽細胞の増殖に適切な期間は2日であることが認められた。これらの細胞は  $37^\circ\text{C}$  で約 6-7% の  $\text{CO}_2$  の存在下でインキュベートされる。

【0020】適切な増殖ののち、細胞を特異的 mRNA の存在につきアッセイするか、またはこのアッセイの前に1または2以上の被験化合物でさらに処理することができる。1または2以上の化合物をそれらが細胞中の1または2以上の mRNA の水準に及ぼす作用につき試験することを目的とする場合、次いで被験化合物を細胞に添加する。最終濃度約  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  が達成されるように被験化合物を添加するのが好ましいことが認められた。これは約  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  の化合物を含有する溶液を最終容量の 10% 添加することにより達成しうる。複数のマイクロタイターディッシュを用いる場合、細胞に対する温度衝撃を緩和するためにディッシュ4個の1グループでディッシュに化合物を添加することが好ましい。各ディッシュに適宜な対照を含める。たとえば表示したウェルに最終容量の 10% (たとえば  $20 \mu\text{l}$ ) の 1 mM トリス、pH 7.3、を添加する。ある種の試験については陽性対照を含めることもでき、その場合は表示したウェルに被験 mRNA の既知のインデューサーを添加する。

【0021】上記のようにウェルへの添加を行ったのち、ディッシュをさらに一定期間インキュベートする。この追加インキュベーションの期間は、用いる細胞およびアッセイすべき mRNA 種に応じて多少異なる。追加インキュベーションの最適期間は本明細書の記載に基づ

いて当業者が容易に決定しうる。たとえばヒト線維芽細胞を用い、化合物がこれらの細胞の顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球-コロニー刺激因子および/またはアルドラーゼに関する mRNA を発現する効力に及ぼす作用を判定する場合、ディッシュをさらに 90-180 分間、 $\text{CO}_2$  インキュベーター ( $37^\circ\text{C}$ 、6-7%  $\text{CO}_2$ ) 中でインキュベートすることが好ましい。ディッシュを4個の同一グループで処理することも好ましく、これによりすべてのディッシュがほぼ同じ期間インキュベートされる。

【0022】上記の追加インキュベーションののち、ディッシュをインキュベーターから取り出し、速やかに裏返して培地を除去する。次いでディッシュをマイクロプレート洗浄装置、たとえばバイオーラド・マイクロプレート・ウォッシャー (バイオーラド、カタログ No. 170-6540) に装入し、 $37^\circ\text{C}$  に予熱したリン酸緩衝食塩液 (PBS)、たとえばヘイゼルトン・ダルベッコのリン酸緩衝食塩液 (カタログ No. 310-4190 AK) を用いて、3回のすすぎ/吸引サイクルで約  $200 \mu\text{l}$  / サイクルにおいてすすぐ。吸引高さは、各洗浄サイクルの終了時にディッシュの各ウェルに約  $100 \mu\text{l}$  の PBS が残るように調節する。次いでディッシュを急激に裏返すことにより残りの PBS を除去する。次いで平らな吸収材料、たとえばペーパータオルを用いて、ウェルの内側を吸収らないように注意してディッシュを吸取る。

【0023】上記に従ってディッシュを吸取ったのち、室温の蒸留水  $50 \mu\text{l}$  をディッシュの各ウェルに添加する。上記のように複数のディッシュにつき作業する場合、ディッシュを4個の1グループで処理することが好ましい。  $50 \mu\text{l}$  の水をディッシュに添加するためには、マルチプルティップ-ピペッター、たとえばソーケン・シグマ・ペット 96 ピペッター (ソーケン東京、日本) を使用し、ディッシュ4個の各グループを1分間隔で処理することが好ましい。水を添加した直後にディッシュを鉈油浴に浮かせ、細胞を溶解させる。鉈油の温度は約  $90^\circ\text{C}$  - 約  $115^\circ\text{C}$  であり、約  $99^\circ\text{C}$  が好ましい。ディッシュは鉈油浴中に約 2-約 12 分間保持され、約 4-約 8 分間が好ましく、約 6 分間が特に好ましい。次いで、好ましくは第2のマルチプルティップ-ピペッター、たとえば上記の種類のものを用いて  $10-12 \mu\text{l}$  の細胞溶解質を各ウェルから吸引する。好ましくは細胞溶解質 ( $10-12 \mu\text{l}$ ) をソーケン先端で約 5-約 15 秒間、特に好ましくは約 7 秒間冷却させ、次いで直ちに、同じ数および形状のウェルを備え、低温のアニーリング/R T 緩衝液  $10 \mu\text{l}$  / ウェルを入れたビニル製ディッシュに移す。あるいは細胞溶解質を容器内で約 1-約 2 分間冷却してもよい。アニーリング/R T 緩衝液は不安定である点を留意すべきである。従って逆転写酵素およびプライマーを含有しないアニーリング/R T 緩衝



液をアッセイの実施直前に調製し、この緩衝液を約30個のディッシュに用いるのに十分なアリコートに分割することが好ましい。次いでアニーリング／RT緩衝液をディッシュに添加する直前に、緩衝液を低温に維持しながらアリコートの緩衝液の1つに逆転写酵素および1または2以上のプライマーを添加する。より多くのアニーリング／RT緩衝液が必要となるのに伴って、他のアリコートの緩衝液に逆転写酵素および1または2以上のプライマーを添加する。第2のマルチプルティップーピペッターは細胞溶解質を次のディッシュから移す前に無菌水ですすぐ。

【0024】ディッシュを水／氷スラリーに浮かせることによりディッシュを予冷し、ディッシュを低温に維持することが好ましい。アニーリング／RT緩衝液を添加した直後にビニル製ディッシュをプログラム可能な温度制御装置（"PTC"）、たとえばM-Jリサーチ・プログラマブル・サーマル・コントローラー（96ウェル型、M-Jリサーチ、マサチューセッツ州ウォータータウン）——そのウェルにそれらの容積の約1/3まで鉱油を充填したもの——に移す。PTCはディッシュを42℃で15分間インキュベートしたのち95℃に5分間昇温させるように予めプログラムされる。加熱サイクル終了後にビニル製ディッシュを4℃に冷却する。多数の小容量試料につき本発明方法を実施する場合は特に、加熱サイクルに際してウェルに鉱油を積層しないことが好ましい。

【0025】ディッシュの各ウェルに10μlのプロテインアーゼK（500μg/ml）を添加し、次いで各ウェルに50μlの鉱油を積層する。この場合も、たとえば前記のいずれかの種類のマルチプルティップーピペッターを用いることが好ましい。次いで、60℃に10分間、続いて95℃に10分間加熱するようにプログラムされたPTCにディッシュを装入する。加熱サイクル終了後、次の工程に進むまでプレートを4℃に冷却する。

【0026】ディッシュの各ウェルに10μlのPCR試薬溶液を、好ましくは前記のいずれかの種類のマルチプルティップーピペッターにより添加する。次いで、92℃に90秒間、続いて60℃に120秒間、続いて72℃に180秒間の31サイクルにプログラムされたPTCにディッシュを移す。サイクル終了後、4℃に冷却するようにPTCをプログラムする。本明細書の記載から当業者に周知のように、他の時間、温度およびサイクル数が可能であり、それらも本発明の範囲に含まれる。

【0027】本方法は多数組のオリゴマーにつき利用することができ、これにより2以上のターゲット配列を同時に増幅することができる。しばしば、それら多数のうち1員子が対照として用いられ、唯一の前提条件はプライマーの相容性、および誘導、リプレッションまたはmRNA半減期の速度論的相容性である。増幅産物が後続のプロベイング／定量のためのユニークDNA配列を提

供するのに十分な長さである限りいかなる組のオリゴマー対も使用しうるが、PCR反応の効率を最大限にするためには増幅産物のサイズを約300bp以下に維持することが好ましい。2方法が用いられ、それらの方法は、人為的なゲノムDNA定量を最小限に抑え、または防止するために、エキソン-イントロンの関係を利用するものである。第1法は、その範囲または範囲の和が約500bpを越える単数または複数のイントロンによって分離されたオリゴマー対を選択することよりなる。増幅産物の長さが増大すると、PCR増幅の効率が低下し、ゲノムDNAの増幅は低下または排除されるが、mRNA依存性PCRは影響を受けることなく増幅する。第2法は、各オリゴマーの最後の数個（2または3個）の塩基が隣接エキソンに相同であるオリゴマーを選択することよりなる。これによりmRNAは増幅されるが、イントロンは増幅されない。このオリゴマーはその3プライム末端において相同性を欠如し、イントロンが複製されるのを阻害するからである。

【0028】PCR試薬溶液には非標識またはノンディスタント（nondistinct）ヌクレオチドを用いることが好ましいが、適宜標識された、または他の形で検出可能なヌクレオチドをPCR試薬溶液に用いることができる。もちろんこれらのヌクレオチドはいずれも目的配列の増幅に影響を及ぼしてはならない。配列の増幅に際して、標識された、または他の検出可能なヌクレオチドを用いる場合、その配列の存在はその標識された、または検出可能なヌクレオチドに適した方法で測定される。これらの方法は当業者に周知であり、ドットプロットオートラジオグラフィーおよび酵素結合抗アビジン／ビオチン検出法がこれに含まれる。標識された、または他の形で検出可能なヌクレオチドの存在下で配列の増幅を行わないことが好ましいが、その場合、1または2以上の増幅配列の存在を後記のように適宜なプローブとのハイブリダイゼーションにより検出することが好ましい。後記のプローブは標識されているが、化学ルミネセンス、蛍光、アクリジニウムエステル、または酵素結合抗アビジン／ビオチン検出法などの方法で検出および測定しうる他の適切なプローブを使用しうる。これらのプローブを調製する方法は本明細書の記載から当業者に周知である。

【0029】ディッシュの各ウェルに10μlの蒸留水を、この場合も好ましくは前記のいずれかの種類のマルチプルティップーピペッターにより添加する。次いで、増幅PCR産物1または2以上を含有する溶液50μlを各ウェルから取り出し、それぞれ250μlのドットプロット変性用緩衝液を入れたマイクロ試験管、たとえば1.2mlマイクロ試験管に装入する。試験管の後続加熱に影響を及ぼす可能性のある底を備えていないラックにマイクロ試験管を挿入することが好ましい。試験管を95℃以上の水に5分間挿入する。得られた変性DNA溶液

は室温またはそれ以上に一定期間保存してから、次の工程へ進めることもできる。

【0030】水に少なくとも1分間浸漬した適宜なナイロン膜に、上記により調製した変性DNAを入れたマイクロ試験管それぞれから250 $\mu$ lを添加する。ナイロン膜はゼータプローブナイロン膜（バイオプローブ、カタログNo. 162-0153）であって、その膜が保護されていない手で触れられないことが好ましい。さらに、膜をドットプロット装置（バイオラド、カタログNo. 170-6545）に装入し、変性DNA溶液の添加前に真空を付与して過剰の水を除去すること、および変性DNA溶液を膜に添加するためにソーケンピペッターを用いることが好ましい。さらにまた、膜と由来するディッシュとを関係付けることができるように、膜に番号およびインデックスを付けるべきである。変性DNA溶液を膜に添加した時点で真空を付与し、乾燥するまで継続することが好ましい。次いで膜を装置から取り出し、2 $\times$ SSCで短時間すすいだのち濾紙上で風乾する。

【0031】膜をスクリーニングするためのプローブは下記により調製される。適宜な容器、たとえば0.5mlエッペンドルフ管中で、下記の成分を列記した順に添加することにより反応混合物を調製する：

1. 10 $\times$ キナーゼ緩衝液 5 $\mu$ l
2. 無菌蒸留水 32 $\mu$ l
3. オリゴマー (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l
4. ガンマ<sup>32</sup>P-ATP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l) 10 $\mu$ l。

【0032】この混合物を65 $^{\circ}$ Cに10分間加熱し、次いで水中で急冷し、この時点でキナーゼ (8U/ $\mu$ l、1 $\mu$ l) を添加する。好ましいキナーゼはT4キナーゼであり、これは市販されている。キナーゼ添加後に反応物を37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートする。次いで約95 $^{\circ}$ Cに5分間加熱することにより反応を停止する。37 $^{\circ}$ Cでのインキュベーションの前および後にサンプリングし、全カウントおよびTCA沈殿性カウント/分を計数することにより、標識取込み率を監視することができる。もちろん放射性同位体の使用を伴う操作はすべて、手袋および適宜なシールドを用いて慎重に実施する。使用するオリゴマープローブは被験mRNAに応じて異なるであろう。使用するオリゴマーは種々の長さおよび/またはコード配列のオリゴマーの組み合わせであってもよい。オリゴマーは本発明が関係する分野の専門家に周知の標準的DNA合成法により調製されるか、または市販されている（たとえばゲノシス (Genosys)、テキサス)。プローブがゲノムDNAではなくmRNAを定量すべく保証するために、隣接する1または2以上のエクソンに相同な配列をそれらの配列の約50%含むオリゴマーを選ぶことが好ましい。

【0033】上記により調製された膜を、約75mlの

ハイブリダイゼーション緩衝液を入れたシール可能なパウチまたはバッグに装入する。食品用プラスチックバッグ、たとえばデージーUSAを用いることが好ましい。バッグをシールし、37 $^{\circ}$ Cの振盪式水浴に少なくとも20分間浸漬する。次いでバッグをわずかに開き、各バッグに1 $\mu$ lの95 $^{\circ}$ C処理プローブ (約1 $\times$ 10<sup>7</sup>cpm/ $\mu$ gオリゴマー) を添加する。余分な空気をもみ出したのち、バッグを再シールし、ハイブリダイゼーションのために振盪式水浴に浸漬する。ハイブリダイゼーション用水浴の温度はプローブおよび被験mRNA種の関数として変化するであろう。このハイブリダイゼーションの温度は本明細書の記載から当業者が容易に決定する。ハイブリダイゼーションは少なくとも4時間実施される。しかしハイブリダイゼーションを一夜継続することが好ましい。

【0034】ハイブリダイゼーションののち、バッグを開き、ハイブリダイゼーション溶液を適切に貯蔵および廃棄するために1または2以上の適宜な容器、たとえば50ml試験管に慎重に注入する。バッグまたは蓋付きプラスチック容器内にまだ残されている膜を約200mlのハイブリダイゼーション用洗浄液ですすぎ、洗浄液を注ぎ出し、それぞれに約200mlの新たなハイブリダイゼーション用洗浄液を添加する。バッグまたはプラスチック容器を再シールし、振盪式水浴に約30分間装入する。この時点での水浴の温度もプローブおよびmRNA種の関数であり、同様に本明細書の記載から当業者が容易に決定する。次いでバッグまたはプラスチック容器を開き、ハイブリダイゼーション洗浄用緩衝液を注ぎ出す。次いで各バッグに少量のハイブリダイゼーション洗浄用緩衝液を添加し、これで膜をすすぎ、そしてハイブリダイゼーション洗浄用緩衝液を廃棄する。バッグまたはプラスチック容器それぞれに200mlの新たなハイブリダイゼーション洗浄用緩衝液を添加し、バッグを再シールし、上記の洗浄に用いたと同じ温度の振盪式水浴に約30分間装入する。すすぎおよび洗浄処理をさらに1回または2回反復する。次いでバッグまたはプラスチック容器から膜を取り出し、濾紙に乗せて風乾する。

【0035】次いで、乾燥した膜を適宜な装置により計数する。たとえば本発明方法において96ウェルディッシュ形式を採用した場合、マトリックス96カウンター (パッカー、A キャンベラ社、コネチカット州) を用いることが好ましい。

【0036】データは下記の様式で集計および分析される：

1) 試験試薬を入れなかった特定のウェルを対照として用いるか、または対照と異なる数値がわずかである試験の場合はすべての位置からのデータを集計して中央値を対照として用いる；

2) 各実験値を対照値で割る；



3) 数値は、本発明方法を実施する者により設定された基準により対照の数値から差があるとみなされる。

【0037】この方法により、対照より大きい数値および小さい数値を識別することができる。

【0038】本発明を高処理量スクリーニングにおいて実施する場合、適宜なコンピュタープログラムを用いて上記操作によるデータを分析することが好ましい。このようなプログラムはメインフレームまたはパーソナルコンピュターを操作する技術分野の専門家は容易に書くことができる。さらに市販のソフトウェア、たとえばロータスまたはエクセル・スプレッドシートを利用してそれらのデータを分析および提示することができる。

【0039】上記方法は、インビトロ源から直接得られた細胞にも適用しうる。たとえば腫瘍または組織細胞をインビトロ源から無菌的な切採または他の適宜な方法（たとえば頬擦過）により得ることができる。ネズミ腫瘍細胞につき本発明を実施した例を以下に記載する。

【0040】無菌的切採により得たネズミ腫瘍細胞を10cmのディッシュに装入し、蓋をし、秤量し、2mg/ml コラゲナーゼ、2%ウシ血清アルブミンおよび4mM L-グルタミンを含有するpH7.4のコラゲナーゼ溶液1ml中で細断する。次いで上記コラゲナーゼ溶液1部、ならびに10%ウシ胎仔血清(FCS)、0.6% L-グルタミン、10U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、0.25μg/ml フンギゾン、17μM パントテン酸カルシウム、33μl d-ビオチン、100μM アスコルビン酸および0.82mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を補充したダルベッコの改良イーグル培地(DMEM)2部を入れたフラスコ内で、細胞をトリプシン処理する。フラスコにアルミニウム箔で蓋をし、回転式振盪機により140rpmで37℃において60分間インキュベートする。インキュベーションに際して細胞懸濁液を15分毎に慎重にピペット操作して組織断片をディスペンスし、クランプ形成した細胞を分断し、15分間のインキュベーション後に細胞懸濁液ml当たり10μlのDNase(2450U/ml)を添加する。次いで細胞懸濁液を上記の補充DMEMにより容量を4倍に増加させて、100ミクロンメッシュのナイロンスクリーンに導通する。細胞を800×gで4℃において10分間遠心分離し、上澄液をデカントし、そして細胞を0℃の補充DMEMに再懸濁する。遠心分離を合計10回反復し、最後に細胞を0℃の補充DMEM(細胞のg当たり4ml)に懸濁する。次いで細胞懸濁液を40ミクロンメッシュのナイロンスクリーンに導通する。

【0041】この時点で細胞をリン酸緩衝食塩液で洗浄し、次いで前記に従って細胞溶解し、目的の配列を増幅し、分析することができる。あるいは細胞をマルチプルウェルディッシュに直接装入し、前記方法に従って使用することもできる。あるいはまた、当業者に周知の方法、たとえばトリパンブルー色素排斥法により細胞の生

存性を判定することができる。次いで10cmの組織培養プレート当たり1×10<sup>7</sup>細胞の密度で細胞を接種する。細胞をコンフルエンスに達するまで増殖させ、組織培養皿から掻き取り、10mlの補充DMEMに再懸濁する。1mlの細胞懸濁液を1.5mlのエッペンドルフ試験管中でペレット化し、ペレットをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、再度ペレット化する。次いで前記に従って細胞を250μlの水中で細胞溶解する。次いで細胞溶解質50μlを目的の逆転写酵素反応混合物50μlと共に使用したのち、目的配列の増幅および検出を行う。これらはすべて前記に従う。

【0042】本明細書および特許請求の範囲全体において用いられる単数形は複数形をも包含し、逆も同様である。以上の記載は複数のマイクロタイターディッシュを利用した本発明方法を開示するが、本発明方法は他の型の容器および他の数の試料にも同様に利用しうる。たとえば本方法を1個のマイクロタイターディッシュ、複数の試験管、または1本の試験管にすら採用することができ、これらに限定されない。本発明方法に関して以上に記載した操作は、必要な修正を加えてこのような他の容器に適用することができる。さらにここに記載した容量はおおまかなものであり、本発明を限定するものではない。容量および量の適切な比率が維持される限り、用いる全容量および全量は本発明の範囲から逸脱することなく増減させることができる。本明細書および特許請求の範囲全体においてH<sub>2</sub>Oまたは水に関する記載はすべて、特に指示しない限り脱イオンされたH<sub>2</sub>Oまたは水に関するものである。

#### 【0043】

##### 【実施例】

##### 実施例1

ヒト線維芽細胞における顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)mRNA水準、アルドラーゼmRNA水準、および顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)mRNA水準に対する化合物の作用のスクリーニング

##### 1a. 初代線維芽細胞系の株化(establishment)

近在由来のヒト包皮組織を細断し、コラゲナーゼ(1mg/ml, 37℃, 10-20%熱不活化(56℃, 1/2時間)ウシ胎仔血清(FCS)中で処理した。細胞は37℃、7%CO<sub>2</sub>において、10%FCS、ならびに10U/mlのペニシリンおよび10μg/mlのストレプトマイシン(P/S)を補充したダルベッコの改良イーグル培地(DMEM)(ヘイゼルトンDME培地、カタログ#51-43378)中での組織培養で維持された。細胞を組織培養フラスコ内でほぼコンフルエンスにまで増殖させた。次いで細胞をトリプシン処理(0.25%トリプシン, 0.02% EDTA)し、DMEMプラス10%FCSおよびP/S中に1対4に

希釈した。次いで細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター（7% CO<sub>2</sub>）に戻した。十分な細胞数が得られるまでトリプシン処理および細胞増殖の操作を反復した。通常は3-5回の反復で十分な細胞数が得られることが認められた。次いで細胞を25%ウシ胎仔血清および10%ジメチルスルホキシドを補充したDMEM中に、約5×10<sup>6</sup>細胞/mlで懸濁した。ジメチルスルホキシド添加後に、細胞を直ちに1mlアリコートに分割し、液体窒素中に貯蔵した。

#### 【0044】1b. 線維芽細胞の増殖

上記1aの記載に従って調製した凍結線維芽細胞のアリコートを37℃の水浴に浸漬することによって急速解凍した。10%FCSおよびP/Sを補充したDMEM 50mlを入れた175cm<sup>2</sup>のフラスコに、解凍細胞を移した。細胞が定着した時点で3-4日毎に、または細胞がコンフルエンスに達した際に、上記1aの記載に従って細胞をトリプシン処理した。細胞はこうして最高12代まで維持された。

#### 【0045】1c. ミクロタイターディッシュの接種

アッセイの2日前に、上記1bに従って調製した線維芽細胞を上記1aに記載した方法に従ってトリプシン処理することにより、フラスコから取出した。10%FCSおよびP/Sを補充したDMEM中に細胞を約5×10<sup>6</sup>細胞/mlの密度に希釈した。次いで200μlの希釈細胞を96ウェルの平底ミクロタイターディッシュの各ウェルに添加した。ディッシュは37℃、7%CO<sub>2</sub>において約48時間インキュベートされた。

#### 【0046】1d. 被験化合物の添加およびインキュベーション

被験化合物を1mMトリス（pH7.3）および0.9%DMSO中に約50μg/mlの濃度に調製し、20μl（最終容量の10%）を2または3ウェル/化合物で添加した。化合物を添加するために一度に約4個を越えるディッシュをインキュベーターから取出すことはなかった。これにより細胞に対する温度衝撃が最小限に抑えられた。対照として、表示された第1ウェルに10ng（20μl）のネズミIL-1アルファ（mIL-1、ファイザー社において既知の組換えDNA法により調製され、大腸菌（*E. coli*）において発現された）、表示された第2ウェルに1ng（20μl）のmIL-1、表示された第3ウェルに0.1ng（20μl）のmIL-1を添加し、他の3個の表示されたウェルに20μl/ウェルの1mMトリス（pH7.3）を添加した。これらのディッシュを37℃でCO<sub>2</sub>インキュベーター（7%CO<sub>2</sub>）中において約180分間インキュベートした。一連のウェルにつき約180分間のインキュベーションを維持するために、1グループのウェルを約5分間隔で処理した。

#### 【0047】1e. 細胞の回収

ディッシュを3-6個のグループでインキュベーターか

ら取出した。可能な限り速やかにプレートを裏返して培地を除去し、バイオードミクロプレート洗浄機（バイオード、カタログ#170-6540）に装入し、予熱した（37℃）PBS（ヘイゼルトン・ダルベッコのリン酸緩衝食塩液、カタログ#310-4190AK）を用いて、3回のすすぎ/吸引サイクルで各サイクルにつき200μlにおいてミクロプレート洗浄機によりすすいだ。吸引高さは、各サイクルの終了時に約100μlのPBSが各ウェルに残留するように調整された。洗浄後にディッシュを急激に裏返し、裏返したディッシュを平らなペーパータオル上で、ウェルの内側を吸取らないように注意して吸取ることにより、残留PBSをウェルから除去した。

#### 【0048】1f. 細胞溶解およびDNA配列の増幅

4個のディッシュのグループにおいて1分間隔で作業して、室温の蒸留水50μlをソークン・シグマ・ペット96ピペッターにより各ウェルに添加した。水を添加した直後にディッシュを99℃の鉱油浴に6分間浮かせた。次いで他のソークン・シグマ・ペット96ピペッターにより10-12μlの細胞溶解質を各ウェルから取出し、先端で7秒間冷却した。次いで10μl/ウェルの低温のアニーリング/RT緩衝液を入れた96ウェルのビニル製ディッシュ（コスター・セロクラスター"U"ビニルプレート、カタログ#2797）に細胞溶解質を移した（それらのディッシュは氷スラリーに乗せてある）。アニーリング/RT緩衝液は下記を含有していた：0.08μlのプライマーSEQ ID NO:1（5' CTTGTAGTGGCTGGCCATCATGTCAA, 1μg/μl）、GM-CSF mRNAにアニール；0.04μlのプライマーSEQ ID NO:2（5' GTGAGCGATGTCAGACAGCTCC, 1μg/μl）、アルドラーゼmRNAにアニール；および0.08μlのプライマーSEQ ID NO:3（5' GAAAGCAGAGGCGAAGGCCGGCAT, 1μg/μl）、G-CSF mRNAにアニール。AMV逆転写酵素はモレキュラー・ジェネティック社から入手され（カタログ#310-4190AK）、RNasinはベーリンガー・マンハイムから入手された（カタログ#799-025）。ディッシュを直ちにM-Jリサーチ・プログラマブル・サーマル・コントローラー（96ウェル型）に移した。この装置は各ウェルに約1/3まで鉱油を満たしておき、そしてディッシュを42℃で15分間インキュベートしたのち95℃で5分間すすぐようにプログラムしておいた。次いでディッシュを4℃に冷却した。各ウェルに10μlのプロテインゼンK（500μg/ml）（ベーリンガー・マンハイム、カタログ#1092-766）を添加し、次いで50μlの軽鉱油（フィッシャー・ケミカル、カタログ#0-121-1）をソークン・ピペッターにより積層した。次いで、60℃に10分間加熱した

のち95℃に10分間と指示するようにプログラムされたM-Jリサーチ・プログラマブル・サーマル・コントローラーにディッシュを装入した。次いでプレートを4℃に冷却した。

【0049】ディッシュの各ウェルに10μlのPCR試薬溶液をソークン・ピペッターにより添加した。PCR試薬溶液は下記を含有していた：0.08μlのプライマーSEQ ID NO:4 (5' GGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCT, 1μg/μl)、GM-CSF配列を増幅；0.04μlのSEQ ID NO:5 (5' CGCAGAAGGGGTCCTGGTGA, 1μg/μl)、アルドラーゼ配列を増幅；0.04μlのSEQ ID NO:6 (5' TTTGCCACCACTCTGGCAGCAG, 1μg/μl)、G-CSF配列を増幅。Taq・ポリメラーゼはパーキン・エルマーから入手された（アンプリ-Taq・ポリメラーゼ、カタログ#N801-0060）。92℃に90秒間、続いて60℃に120秒間、続いて72℃に180秒間の31サイクルにプログラムされたM-Jリサーチ・プログラマブル・サーマル・コントローラーにディッシュを移した。また、このコントローラーは31回目のサイクルののちディッシュを4℃に冷却するようにプログラムされた。

#### 【0050】1g. 増幅DNA配列の検出

上記1fの記載に従って処理したディッシュの各ウェルに、無菌蒸留水50μlをソークン・ピペッターにより添加した。次いでソークン・ピペッターを用いて各ウェルから50μlを取出し、250μlのドット・プロット変性用緩衝液を入れた1.2mlのマイクロ試験管に装入した。底を取除いたラック内に試験管を配置した。ラックを95℃以上の水浴に5分間挿入した。次いでソークン・ピペッターを用いて250μlを取出し、バイオ・ラド・ゼータープローブナイロンフィルター（カタログ#162-0153）（水に1分間以上浸漬し、それに真空を付与して過剰の水を除去したもの）を入れたバイオ・ラド・ドット・プロット装置（カタログ#170-6545）に装入した。バイオ・ラド・ゼータープローブナイロンフィルターは手袋で保護した手で取扱い、フィルターにペンで番号およびインデックスを付けた。プロットしたのち、真空を付与し、すべてのウェルが乾燥するまで続けた。

【0051】フィルターを装置から取出し、2×SSCで短期間すすいだのち、濾紙上で風乾した。次いでフィルターをシール可能なプラスチックバッグに装入し、これに約75mlのハイブリダイゼーション緩衝液を添加した。バッグをシールし、37℃の振盪式水浴に少なくとも20分間浸漬した。次いでバッグをわずかに開き、1μgの95℃処理プローブ（それぞれ約1×10<sup>7</sup>cpm/μgのオリゴマープローブSEQ ID NO:7 (5' GCAGGTCGGCTCCTGGAGGTC

AAACAT)、GM-CSF配列を検出；SEQ ID NO:8 (5' CTGGCACAGGAGAGGGGCGGGTG)、アルドラーゼ配列を検出；SEQ ID NO:9 (5' TTCCCAGTTCTTCCATCTGCTGCCAGATGG)、G-CSF配列を検出)をそれぞれに添加した。余分な空気をバッグからもみ出したのち、バッグを再シールした。バッグを37℃の振盪式水浴に少なくとも4時間浸漬した。次いでハイブリダイゼーション溶液を貯蔵および廃棄のために50mlの試験管に慎重に注入した。

【0052】フィルターをそれぞれ約200mlのハイブリダイゼーション洗浄液ですすぎ、次いで洗浄液を除去し、約200mlの新たなハイブリダイゼーション洗浄液を添加した。バッグを再シールし、52℃の振盪式水浴に少なくとも30分間装入した。

【0053】このすすぎおよび洗浄処理を各フィルターにつき1回または2回反復した。

【0054】最後のすすぎおよび洗浄ののち、フィルターをバッグから取出して濾紙上に移し、風乾した。乾燥した時点でフィルターをマトリックス96カウンターにより計数した。

【0055】マトリックス96カウンターから得たデータをパーソナルコンピューターにより、VAXメインフレームコンピューターへの移行用に集計およびフォーマット化した。このデータをVAXメインフレームコンピューターによる操作のために書かれたソフトウェアプログラムを用いて前記に従って分析した。

【0056】この実施例1に記載した方法により、多数の化合物をそれらがGM-CSF、アルドラーゼおよび/またはG-CSFをコードするmRNAの水準に作用する効力につき、1週間でスクリーニングすることができた。

#### 【0057】実施例2

##### ヒトLDLrの対立遺伝子 (allele) 判定

楊枝で個々の頬の内側を擦過することにより頬細胞を採取した。細胞を0.5mlエッペンドルフ試験管中の95℃H<sub>2</sub>O 200μlに懸濁し、4分間煮沸した。試験管を氷上で急冷したのち、8μlの10mg/mlプロテイナーゼKを添加し、試料を60℃で20分間インキュベートした。次いで細胞溶解質を90℃で10分間、加熱不活化した。次いで50μlの細胞溶解質を下記よりなるPCR試薬溶液50μlに添加した：41.5μlのH<sub>2</sub>O、5.5μlの20×PCR緩衝液、2μlの25mM dNTP、0.5μlのTaqポリメラーゼ（パーキン・エルマー）、0.25μlのプライマーSEQ ID NO:10およびSEQ ID NO:11 (5' AGTGCCAACCGCCTCACA GGおよび5' CCTCTCACACCAGTTCAC TC, それぞれ1μg/μl)。次いでLDLr遺伝子フラグメントを95℃で1.5分間、60℃で2分間、



21

および72℃で3分間からなるPCRサイクル30回により増幅した。次いでこの増幅DNAを実施例1の記載に従ってドットプロットし、対立遺伝子特異性の放射性オリゴマーSEQ ID NO:12またはSEQ ID NO:13 (5' AGGATATGGTCCTCTTCCAまたは5' TGGAAGAGAACCATATCCT) でプローブした。次いで結合プローブをベータ・スコープ・プロット・アナライザー (ベータジェン) により定量した。

【0058】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

CTGTAGTGG CTGGCCATCA TGGTCAA 27

配列番号: 2

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

GTGAGCGATG TCAGACAGCT CC 22

配列番号: 3

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状配列

GAAAGCAGAG GCGAAGGCCG GCAT 24

配列番号: 4

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

GGCACTGTGG CCTGCAGCAT CTCT 24

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

CGCAGAAGGG GTCCTGGTGA 20

配列番号: 6

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

22

TTTGCCACCA CCATCTGGCA GCAG 24

配列番号: 7

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

GCAGGTCGGC TCCTGGAGGT CAAACAT 27

配列番号: 8

10 配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

CTGGCACAGG AGAGGGGCGG GTG 23

配列番号: 9

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

20 トポロジー: 直線状

配列

TTCCCAGTTC TTCCATCTGC TGCCAGATGG 30

配列番号: 10

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

AGTGCCAACC GCCTCACAGG 20

30 配列番号: 11

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

CCTCTCACAC CAGTTCACCTC 20

配列番号: 12

配列の長さ: 19

配列の型: 核酸

40 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

AGGATATGGT CCTCTTCCA 19

配列番号: 13

配列の長さ: 19

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列

50 TGGAAGAGAA CCATATCCT 19

フロントページの続き

(72)発明者 ラルフ・イー・デヴィッドソン  
アメリカ合衆国コネチカット州06359, ノ  
ース・ストニントン, パトリシア・アベニ  
ュー 62ーディー

(72)発明者 デニス・エイ・ペレイラ  
アメリカ合衆国コネチカット州06378, ス  
トニントン, ペコット・トレイル 1027